

EINE EINFACHE FESTPHASENTECHNIK
ZUR RADIOIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG
VON ÖSTRIOL IM SERUM VON SCHWANGEREN

Ludwig Heider

Diss. München
1964

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Zander

Eine einfache Festphasentechnik zur radio-
immunologischen Bestimmung von Östriol im
Serum von Schwangeren

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

Ludwig Heider

aus

Rimsting

Jahr

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Erich Kuss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Zander

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1984



Christoph & Michael
HOFBAUER
drucken + binden
Adalbertstrasse 18
8000 München 40

Inhaltsverzeichnis

=====

I. Einleitung

II. Material und Methoden

A) Material

Unmarkierte Steroide

Lösungen unmarkierter Steroide

Markierte Steroide

Lösungen markierter Steroide

Antiserum

Gel

Scintillationslösung

Sonstiges

Geräte

B) Methoden

Radioimmunologische Methoden

Statistische Methoden

III. Ergebnisse

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literatur

Anhang



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Meinen Eltern

I. Einleitung

=====

Die Östriolproduktion der Schwangeren gilt als zuverlässiger Indikator des fetalen Wohlbefindens (8, 12, 17, 19, 25). Sie wird für die Überwachung von Risikoschwangerschaften hinreichend zuverlässig durch die Konzentration des unkongjugierten Östriol im Serum oder durch die Menge der mit dem Urin ausgeschiedenen Östrogen-Kongjugate reflektiert. Wegen der bekannten Nachteile der Urinuntersuchungen (Sammelfehler, 24-stündige Verzögerung, Ausscheidungsstörungen) werden seit einigen Jahren Blut- oder Serumuntersuchungen bevorzugt (7), obwohl die Konzentration des Analyten hier mit etwa 50 nmol/l etwa tausendfach niedriger liegt. Die Bestimmung des freien Östriol im Serum ist auch deswegen problematischer als die Bestimmung der Gesamt-Östrogene des Urins, weil höhere Anforderungen nicht nur an die Empfindlichkeit der Methode gestellt werden, sondern auch an ihre Spezifität. Es muß nicht nur zwischen den einzelnen Östrogenen mit unterschiedlichen Ring D Substituenten - Östron, Östradiol und Östriol - sondern auch zwischen dem Östriol und seinen Kongjugaten mit ihren Schwefelsäure- und Glucuronsäure-Resten nicht nur am Ring D (C 16, C 17), sondern auch am Ring A (C 3)



differenziert werden. Die Serumkonzentration der Konjugate ist etwa zwanzigmal, die der C 3-Konjugate etwa zweimal höher als die des unkonjugierten Östriols (18).

Zur Betsimmung des Östriol im Serum sind radioimmunologische Methoden entwickelt worden. Ihre notwendige Spezifität gegen Ring - D Substituenten wurde dadurch erreicht, daß Antikörper gegen Östriol - C 6 - Konjugat - Immunogene entwickelt wurden, die den Ring - D exponieren. Die notwendige Spezifität gegen kreuzreagierende Ring - A - Konjugate - Östriol - C 3 - Sulfat und - Glucuronosid - und gegen unspezifisch interferierende Substanzen wurde bisher dadurch erreicht, daß der Analyt Östriol noch vor der Inkubation mit dem Antiserum abgetrennt wurde, meist durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (7, 18).

Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln erschweren aber eine serielle und maschinelle Probenbearbeitung, eine Voraussetzung für die angestrebte Einführung von Östriolbestimmungen in die klinische Routineanalytik. Da es wenig erfolgversprechend erschien,

eine höhere Spezifität des Antiserums durch eine Änderung der determinanten Struktur des Immunogens zu erreichen, wurde in unseren Laboratorium versucht (22), über ein Festphasensystem durch Modifikation der Matrix die Spezifität zu steigern. Als Festphasensystem kam in Frage die adsorptive oder kovalente Bindung von Antikörpern an Agarose, Cellulose, Sephadex, Enzacryl AA, Glaspartikel und Nylon (3, 4, 20, 21). Der Einschluß von Antikörpern in ein poröses Polyarylamid-Gel erschien besonders geeignet zu sein (9). Derartige Gele können für manuelle wie auch für mechanisierte Analyseverfahren eingesetzt werden (24); ihre Matrix kann durch Mischpolymerisation variiert werden.

In den vorangegangenen Untersuchungen war gezeigt worden, daß sich eine Matrix aus Methacrylsäure und Acrylamid zur Östriolbestimmung eignet. Die Kreuzreaktivität des eingeschlossenen Antiserums gegen Östriol - 3 - Glucuronosid wird, offenbar durch Matrix-Effekte, von 61 % auf 4 % und die gegen Östriol - 3- Sulfat von 47 % auf 6 % erniedrigt. Diese erfolgversprechende Methode war jedoch relativ

umständlich zu handhaben und sie war bisher nur an artifiziellen Lösungen von Östrogenen, nicht an biologischem Material geprüft worden (22).

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Methode der radioimmunologischen Bestimmung von Östriol mit immobilisierten Antikörpern so zu vereinfachen, daß sie sich als Standardmethode eines Routinelaboratoriums eignet. Die analytische Zuverlässigkeit der Methode war zu charakterisieren, insbesondere waren die Ergebnisse der Bestimmungen des Östriols im Serum von Schwangeren mit Hilfe der neuentwickelten Methode mit den Ergebnissen zu vergleichen, die mit Referenzmethoden erzielt wurden.

II. Material und Methoden

=====

A. Material

Unmarkierte Steroide

Östriol von E. Merck, Darmstadt, Deutschland;
Östriol - 3 β - D - Glucuronosid, Natriumsalz,
von Sigma Chemical Company, St. Louis, USA;
Östriol - 3 - Sulfat, Natriumsalz, von Fa. Leo,
Helsingborg, Schweden.

Lösungen unmarkierte Steroide

Je 1,0 mg Östriol - 3 - Glucuronosid und
Östriol - 3 - Sulfat wird in 5,0 ml aqua pro
injectione und 5,0 ml Äthanol gelöst; Östriol
wird in 10,0 ml Methanol gelöst. Anschliessend
werden die Konzentrationen durch UV-Spektro-
photometrie (Zeiss PMQ 2) geprüft und mit
50%-igem Äthanol weiter verdünnt. Zur Herstellung

der Gebrauchslösung werden Aliquote entnommen und im Stickstoffstrom eingedampft (Zimmertemperatur). Der Rückstand wird über Nacht mit Albumin-Phosphatpuffer-Lösung aufgenommen. (Konzentrationen von 3.46 - 346 pmol/ml).

Markierte Steroide

(2, 4, 6, 7 - ^3H) - Östriol (112 Ci/mmol) (New England Nuclear Corporation, Boston/Mass., USA) wird über eine Sephadex LH - 20 - Säule (40 x 1 cm), (Benzol, Methanol; 85 : 15; v/v) gereinigt. (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Östriol - 6 - carboxymethoxim - ^{125}J -Histamin (2 200 Ci/mmol) wird synthetisiert (11) und über eine Kieselgel 60 - Säule (40 x 1 cm) (Benzol, Äthanol, Essigsäure; 75 : 24 : 1; v/v) gereinigt (Fa. E.Merck, Darmstadt).

Lösungen markierter Steroide

Das ^3H -Östriol wird in Benzol-Äthanol (80 : 20), das ^{125}J -Östriol-Derivat in absolutem Äthanol gelöst; diese Stammlösungen werden bei minus 20°C aufbewahrt.

Zur Herstellung der Gebrauchslösungen (^3H -Östriol: 10 000 - 15 000 cpm/100 μl ; ^{125}J -Östriol-Derivat: 25 000 - 35 000 cpm/100 μl) werden 1,0 ml unter Stickstoffstrom eingedampft, der Rückstand mit Albumin-Phosphatpuffer-Lösung aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Aufbewahrung bei 4°C .

Antiserum

Anti-Östriol - C_6 - Konjugat - Antikörper wurden in Kaninchen induziert (5, 14, 16). Aus dem Serum werden die Gamma-Globuline in üblicher Weise gewonnen. Nach der 3. Ammonium-Sulfat-Fällung wird der Niederschlag gegen 0,85%-ige NaCl-Lösung (pH: 8,0) dialysiert, bis kein Sulfat im Dialysat nachzuweisen ist. Anschliessend wird mit 0,85%-iger Kochsalzlösung auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

Davon ausgehend wird durch Verdünnung von 1 + 19 mit Phosphatpuffer eine Gamma-Globulinlösung hergestellt, von der je 1,0 ml zur Polymerisation verwendet werden. (K_{ASS} : $1,2 \times 10^{10}$ l/mol unter Verwendung von 3H markiertem Östriol im wässrigen System).

Gel

Acrylamid und Methacrylsäure von der Fa. E.Merck, Darmstadt, Deutschland; NN' - Methylenbisacrylamid von der Fa. Bio-Rad GmbH, München, Deutschland; N,N - N', N' Tetramethyläthylendiamin und Riboflavin von der Fa. Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland. Acrylamid und Methacrylsäure (3 mol : 2 mol) werden mit und ohne Zusatz von Anti-Östriol- C 6 - Konjugat - Immunglobulin in üblicher Weise polymerisiert (22).

Reagenziensatz zur Östriol-Bestimmung

"Oestriol (unconjugated) RIA Kit" der Fa. Amersham-Buchler.

Scintillationslösung

2,5 - Diphenyloxazol (PPO) und 1,4 - bis - 2
(4 - methyl - 5 - phenyloxazolyl)-benzol (POPOP)
von der Fa. W. Zinsser, Frankfurt, Deutschland;
Bio - Solv (BBS - 3) der Fa. Beckmann - Instruments -
GmbH, München, Deutschland.

100,0 gr PPO und 1,25 gr POPOP werden in 1,0 l
Toluol gelöst. Von dieser Lösung werden 42,0 ml
zusammen mit 117,0 ml Biosolv zu 1,0 l Toluol
gegeben und gemischt. Jedem Scintillationsgläschen
werden 15,0 ml dieser Lösung zugesetzt.

Sonstiges

Albumin-Phosphatpuffer-Lösung (1/15 mol/l),
pH 7,2, mit 5.0 mmol/l NaN_3 und 1 mg/ml Rinder-
albumin.

Inkubationslösung:

400 μ l ^{125}J -Östriol-Derivat - "Gebrauchslösung"
(ca. 130 000 cpm) + 100 μ l Serum oder Albumin-
Pufferlösung mit bekannten Mengen unmarkierter
Steroide (0.3 - 34 pmol).

Alle wässrigen Lösungen werden mit "aqua pro
injectione" der Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland,
zubereitet.

Essigsäure-äthylester und n-Hexan von Fa. E. Merck,
Darmstadt, Deutschland.

Geräte

Messgerät für Gamma-Strahlen, Typ 1270, der Fa.
LKB (Zählrohrbeute 69 %).

Messgerät für Beta-Strahlen, Modell 2425, der Fa.
Packard (Zählrohrbeute 52 %).

Zentrifuge zur Trennung von fester und flüssiger
Phase, Typ Rotixa, der Fa. Hettich.

Analysenwaage, Typ 416 der Fa. Mettler

Elektronische Datenverarbeitung mit System 2200
der Fa. Wang-Laboratories.

B. Methoden

Radioimmunologische Östriolbestimmung

- a) mit immobilisierten Antikörpern
(Festphasenmethode)

Eine definierte Menge des Anti-Östriol-Antikörper-Gels wird aus einem gläsernen Scheidetrichter in Eppendorf-Reaktionsgefäße eingebracht, deren Boden vorher in der Mittellinie mit einem Skalpell aufgeschlitzt wurde (1,5 mm). Im Halsbereich des Scheidetrichters steckt ein speziell gefertigter Teflonkonus. Der Konus besitzt eine zylindrische Bohrung, die durch leichtes Klopfen mit Gel aus dem Trichter gefüllt wird. Nach Drehung des Konus um 180° entleert sich die Gelmenge aus der zylindrischen Bohrung in das Reaktionsgefäß.

Die Gefässe werden mit geringem Druck möglichst senkrecht auf Polyäthylen-Röhrchen passender Grösse (12 mm Aussendurchmesser, 7 cm Höhe) aufgesetzt. Diese Gefässe besitzen ein Luftloch dicht unter der Höhe des Bodens der Gel-Gefässe und stehen in den Zählgläschenhaltern des γ -Zählers.

Auf das Gel wird 500 μ l Inkubationslösung pipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur wird durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen die Inkubationslösung mit dem freien Indikatorhapten vom Gel und dem daran gebundenen Indikatorhapten-Anteil abgetrennt: Zuerst wird 30 s mit 3000 Upm zentrifugiert. Nach Überschichten des fast trockenen Gels mit 1 ml Albumin-Phosphatpuffer-Lösung (Braun-Dispensette) wird 5 min mit 3 000 Upm zentrifugiert. Die gelhaltigen Gefässe werden abgenommen und verworfen. Die Gefässe mit der flüssigen Phase werden zur Messung der Radioaktivität in das Zählgerät eingebracht.

- b) mit freien Antikörpern und ^3H -Östriol bzw. ^{125}J -Östriol-Derivat als Indikatorliganden
(Referenzmethode A bzw. modifizierte Reverenz-
methode A)

100 μl Serum und 3 ml Essigester - n - Hexan im Verhältnis 3 : 2 werden in Spitzgläser mit Schliffstopfen pipettiert. Nach 60 sec. Rütteln am Vortex wird der Überstand abgehoben und das verbleibende Serum erneut mit 3 ml des oben genannten Gemisches extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und unter Stickstoffstrom eingedampft. Die Rückstände werden sodann mit jeweils 1 ml Albuminphosphatpuffer unter 30-minütigem Rütteln gelöst. In Eppendorf-Reaktionsgefäße werden 200 μl ^3H -Östriol bzw. ^{125}J -Östriol-Derivat-Lösung in Albuminphosphatpuffer und entweder steigende Mengen Östriol (3,46 - 69,2 pmol/ml) in 800 μl Albuminphosphatpuffer-Lösung (Standard zur Bestimmung der Standardkurve) oder 100 μl der Probe pipettiert. Die Volumenunterschiede werden mit Albuminphosphatpuffer-Lösung ausgeglichen und jeweils 100 μl Antikörperlösung (Verdünnung 0,05 %) hinzugegeben. Nach je 30-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur und bei 4 ° C werden je 100 μl Kohlesuspension den Proben hinzugefügt, anschliessend geschüttelt,

für 15 Minuten bei 4° C inkubiert und schliesslich 2 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert. Vom Überstand werden je 1 ml abgehoben und bei Verwendung von ^3H -Östriol mit 15 ml Scintillationslösung versetzt (7). Die Radioaktivität wird im Szintillationszähler bzw. γ - Strahlen-Meßgerät bestimmt.

- c) mit freien Antikörpern und ^{125}J -Östriol-Derivat als Indikator Ligand (Referenzmethode B, Reagenzien-satz der Fa. Amersham-Buchler)

Die Bestimmung erfolgte nach den Angaben des Beipackzettels.

Statistische Methoden

Die Berechnung der Richtigkeit, Präzision und Empfindlichkeit des Festphasensystems erfolgte nach üblichen Verfahren (7, 10). Für den Methodenvergleich nach dem Verfahren der Hauptkomponente (1) wurde das elektronische Datenverarbeitungssystem 2200 der Fa. Wang-Laboratories verwendet.

III. Ergebnisse

=====

1.) Dosierung des Gels

Die Ergebnisse der Auswaagen von 10 volumetrischen Abfüllungen des Gels sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die statistische Auswertung ergab einen Variationskoeffizienten V_k von 1,7 %.

Auswaagen des dosierten Gels (mg)

96

98

97

96

93

93

95

94

94

95

$\bar{x}$: 93,5 mg

s : 1,6 mg

Tab. 1: Zuverlässigkeit der Dosierung des Antikörper-Gels. Die mit dem Scheidetrichter dosierten Gelmengen wurden mit der Analysenwaage gewogen

2.) Bindung des Indikatoliganden an die Gel Matrix.

Nach Infiltration der Inkubationslösung durch die Gel-Matrix (Gel ohne Antikörper-Zusatz) wird im Filtrat etwa 93 % der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden (Tab.2). 7 % der Radioaktivität wird also unspezifisch gebunden oder geht durch die Manipulation verloren.

Radioaktivität der Inkubationslösung (cpm)	Radioaktivität der Filtrate (cpm)
121 738	113 217
120 933	112 552
121 420	112 848
121 411	112 910
121 038	112 547
$\bar{x} : 121\ 308$	$\bar{x} : 112\ 815$
$s : 325$	$s : 280$

Restliche Radioaktivität im Gel (cpm):

$(121\ 308 + 325) - (112\ 815 - 280) = 9098$ (Maximum $\hat{=}$ 7,5 % der
inkubierten Radioaktivität)

$(121\ 308 - 325) - (112\ 815 + 280) = 7888$ (Minimum $\hat{=}$ 6,5 % der
inkubierten Radioaktivität)

Tab. 2: Bindung des ^{125}J -Östriol-Derivats an die
Matrix (Gel ohne Antikörper-Zusatz). Inkubation
und Zentrifugation siehe "Material und Methoden"

- 3.) Bindung des Indikatorliganden an das Antikörper-Gel und Zuverlässigkeit der Abtrennung nicht - gebundener Liganden durch Zentrifugation.

Die Zuverlässigkeit der Trennung der gebundenen von der nicht gebundenen Radioaktivität durch Zentrifugation wird durch die Angaben der Tabelle 3 belegt.

In keinem Fall waren nachweisbare Mengen des Gels durch den Schlitz im Boden der Reaktionsgefäße in die Zählgefäße ausgetreten.

Methode	A	B	C	D	E
Radioaktivität eingesetzt (cpm)	126 133 125 780 124 735 $\bar{x}$: 125 450 s : 576 124 989 125 612				
Radioaktivität im Filtrat (cpm)	51 733 52 562 50 911 51 613 51 918 $\bar{x}$: 51 747 s : 594	51 933 52 817 51 613 51 217 52 186 $\bar{x}$: 51 953 s : 604	54 622 54 989 55 618 55 982 55 017 $\bar{x}$: 55 246 s : 545	61 617 61 013 62 001 61 214 61 429 $\bar{x}$: 61 455 s : 380	62 826 62 817 61 813 61 998 62 417 $\bar{x}$: 62 372 s : 465
Radioaktivität im Gel ($\hat{=}$ Bo) (cpm)	max.: 74873 min.: 72533	max.: 74677 min.: 72317	max.: 71325 min.: 69083	max.: 64951 min.: 63039	max.: 64119 min.: 62037
Bo (%) relativ zur eingesetzten Radioaktivität	max.: 59.7 min.: 57.8	max.: 59.5 min.: 57.6	max.: 56.8 min.: 55.0	max.: 51.7 min.: 50.2	max.: 51.1 min.: 49.4

Tab.: 3: Zuverlässigkeit der Abtrennung der Inkubationslösung vom Antikörper-Gel. Inkubationsbedingungen siehe Material und Methoden; Berechnung der Radioaktivität im Gel siehe Tab. 2. Zentrifugation (3 000 Upm) mit und ohne Nachwaschen:

A 30 s Zentrifugation des Ansatzes

B 2 min. Zentrifugation des Ansatzes

C 5 min. Zentrifugation des Ansatzes nach Zusatz von 0,5 ml Pufferlösung

D 30 s Zentrifugation des Ansatzes und
5 min. Zentrifugation nach Zusatz von 1 ml Pufferlösung

E 30 s Zentrifugation des Ansatzes und
3 x 5 min. Zentrifugation nach Zusatz von je 1 ml Pufferlösung

- 4.) Inhibition der Bindung von ^3H -Östriol und von ^{125}J -Östriol-Derivat durch Östriol, Östriol - 3 - Glucuronosid und Östriol - 3 - Sulfat im wässrigen (modifizierte Referenzmethode A) und Festphasensystem

Die Affinitäten des mobilen und des immobilisierten Antikörpers zu Östriol, Östriol - 3 - Glucuronosid und Östriol - 3 - Sulfat wurden als Hemmung der Bindungen von ^3H -Östriol und von ^{125}J -Östriol-Derivat an den korrespondierenden Antikörper bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

- 5.) Kreuzreaktivität von Östriol - 3 - Glucuronosid, Östriol - 3 - Sulfat, Östradiol und Östron im Gemisch

Tabelle 4 zeigt das Ausmaß der Kreuzreaktivität von Östriol - 3-Glucuronosid, Östriol - 3 - Sulfat, Östradiol und Östron im Gemisch, jeweils im wässrigen (modifizierte Referenzmethode A) und Festphasensystem (in beiden Systemen Verwendung von ^{125}J -Östriol-Derivat als markiertes Hapten). Die Kreuzreaktivitäten für Östradiol und Östron wurden nur im Festphasensystem durchgeführt.

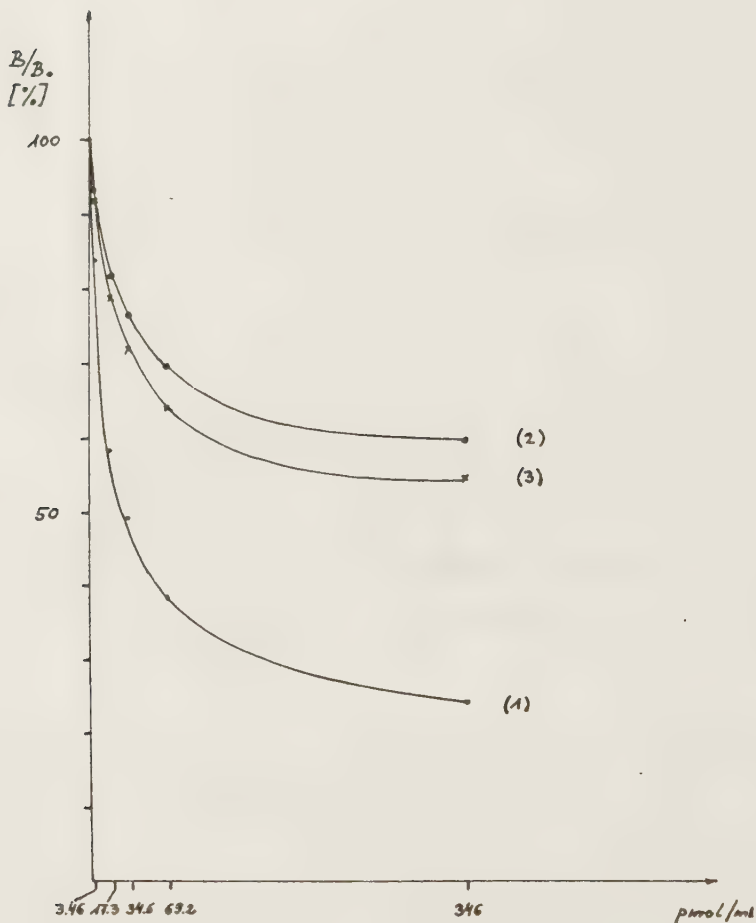


Abb. 1 Konkurrenz der Bindung von ^{125}J -Östriol-6cmo-His
an mobile Anti-Östriol - C 6 - Konjugat- Antikörper
(modifizierte Referenzmethode A)
Dosiswirkungskurven von
Östriol (1)
Östriol - 3 - Glucuronosid (2)
Östriol - 3 - Sulfat (3)
 $B_0 = 30\,000$ cpm
Jeder Maßwert stellt den Mittelwert aus
Doppelbestimmungen dar.
Die Abweichungen vom Mittelwert betragen
weniger als ± 1200 cpm

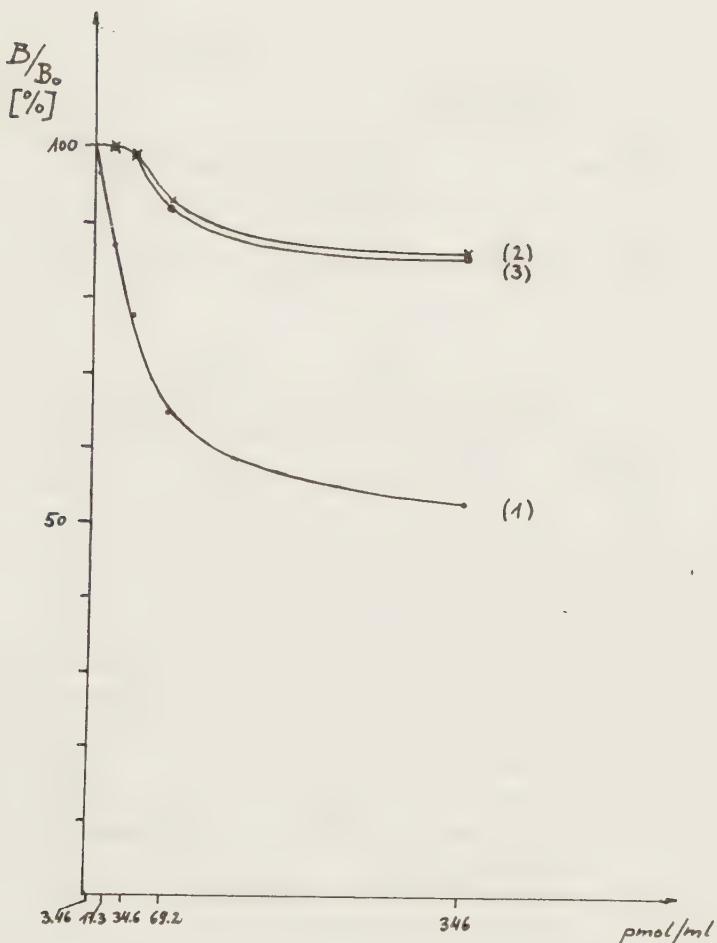


Abb. 2 Konkurrenz der Bindung von ^{125}J -Östriol - 6 cmo-His an immobilisierte Anti-Östriol - C 6 - Konjugat-Antikörper
 Dosiswirkungskurven von
 Östriol (1)
 Östriol - 3 - Glucuronosid (2)
 Östriol - 3 - Sulfat (3)
 $B_0 = 72\,000$ cpm
 Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert aus Doppelbestimmungen dar. Die Abweichungen vom Mittelwert betragen weniger als ± 1800 cpm.
 Die Gleichgewichtskonzentrationen waren nach 20 Minuten Inkubationszeit erreicht und zeigten auch bei 2 Stunden Inkubationszeit keine Änderung.

Ö ₃	eingesetzte Konzentrationen (pmol/ml)				gemessene Konzentrationen (pmol/ml)	
	Ö ₃ -3-S	Ö ₃ -3-Gl	Ö ₂	Ö ₁	Ö ₃ -Äqu. wässr. Phase	Ö ₃ -Äqu. Festphase
5,76	--	--	--	--	5,6	5,55
5,76	5,76	5,76	--	--	11,7	7,6
5,76	11,5	11,5	--	--	18	11,7
5,76	23	23	--	--	26	12,8
6,92	--	--	--	--	nicht	6,8
6,92	--	--	6,92	6,92	durchgeführt	7,2

Tab. 4 Kreuzreaktivität des mobilen und immobilisierten Antikörpers

1 - 4: Kreuzreaktivität von Östriol - 3 - Glucuronosid
und Östriol - 3 - Sulfat mit Zusatz von Östriol
im wässrigen (modifizierte Referenzmethode A) und
Festphasensystem

5 - 6: Kreuzreaktivität von Östradiol und Östron mit Zusatz
von Östriol im Festphasensystem

Ö₃, Ö₃-3-Gl, Ö₃-3-S, Ö₂ und Ö₁: Konzentrationen von Östriol
Östriol-3-Glucuronosid
Östriol -3-Sulfat,
Östradiol und Östron im
eingesetzten Standard.

Ö₃-Äqu.wässrig: radioimmunologisch bestimmte Östriolkonzentration
der Proben im wässrigen System (modifizierte
Referenzmethode A)

Ö₃-Äqu.Festphase: radioimmunologisch bestimmte Östriol-Konzentrationen
der Proben im Festphasensystem

B₀ = 68 500 cpm

6.) Bestimmung der Konzentration von Östriol im Serum schwangerer Frauen mit Referenzmethode A, Referenzmethode B und mit dem Festphasensystem

Die Ergebnisse der Bestimmungen der Östriolkonzentrationen von 20 willkürlich ausgewählten Seren schwangerer Frauen zwischen der 4. und 40. Schwangerschaftswoche sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die Testbedingungen entsprechen der unter Punkt "Methoden" beschriebenen Versuchsanordnung. Die der Messung zugrundeliegende Standardkurve im wässrigen System entspricht der Kurve 1 in Abbildung 3. Die Standardkurve des Festphasensystems wurde mit einer neu polymerisierten Gelcharge angefertigt und entspricht der Kurve 2 in Abbildung 3.

Serum Nr.	Referenzmethode A	Testmethode (Festphasensystem)	Referenzmethode B
1	4,2	0,5	4,8
2	24,9	28,4	48,1
3	49,2	67,5	80,2
4	12,1	17,3	31,8
5	1,7	6,9	9,0
6	20,8	19,7	32,8
7	46,7	48,4	54,0
8	13,8	10,4	16,9
9	30,1	33,5	46,3
10	13,5	17,3	25,9
11	17,6	23,8	37,0
12	1,7	2,9	5,9
13	21,8	38,8	40,5
14	3,8	11,4	13,8
15	38,9	70,9	80,6
16	2,1	3,5	5,6
17	0,8	1,7	3,7
18	38,8	52,7	81,0
19	14,9	27	36,7
20	15,2	26,3	36,4
$\bar{x}$	18,63	25,45	34,55

Tab. 5 Ergebnisse der Östriolbestimmung nach 3 verschiedenen Methoden (pmol/ml)

$\bar{x}$: Mittelwerte aller mit einer Methode gemessenen Östriolkonzentrationen (pmol/ml)

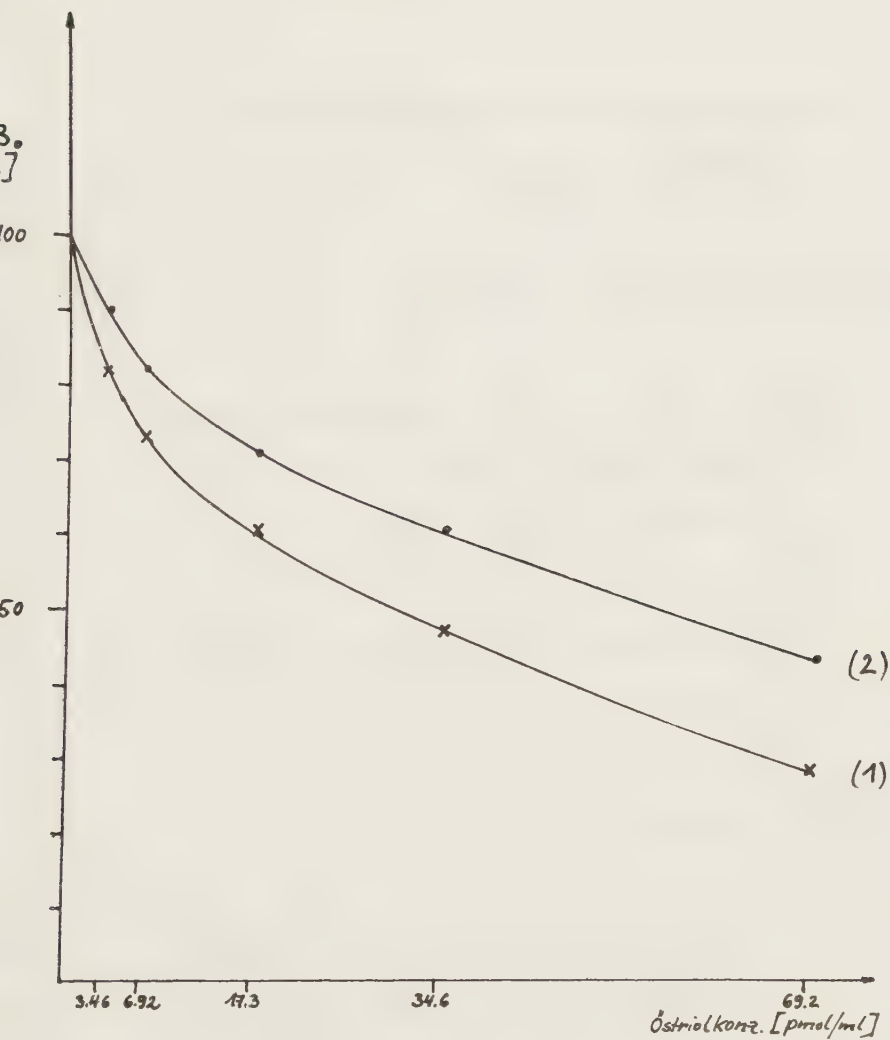


Abb. 3: Konkurrenz der Bindung von ^3H -Östriol an mobile (Kurve 1) und von ^{125}I -Östriol-6-cmo-His an immobilisierte (Kurve 2) Anti-Östriol - C 6 - Konjugat-Antikörper.

Dosierungskurven von Östriol

B_0 (Kurve 1) = 77 000 cpm

B_0 (Kurve 2) = 32 000 cpm

7.) Zuverlässigkeit der Östriolbestimmung im Festphasensystem

a) Richtigkeit

Die durchschnittliche Wiederfindung bekannter Mengen Östriol (Konzentrationen von 3,4 bis 86,8 pmol/ml) im Serum betrug 103,9 % mit $s = 3,13$ % und einem relativen Variationskoeffizienten $V_k = 3,01$ %.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

b) Präzision

Zur Bestimmung der Intraassayvarianz wurden zwei Seren am gleichen Tag in je 20 verschiedenen Ansätzen bestimmt. Dabei ergaben sich für beide Seren folgender Mittelwert $\bar{x}$, folgende Standardabweichung s und folgender relativer Variationskoeffizient V_k :

Serum A : $\bar{x} = 18,5$ pmol/ml, $s = 0,75$ pmol/ml, $V_k = 4,1$ %

Serum B : $\bar{x} = 34,8$ pmol/ml, $s = 1,31$ pmol/ml, $V_k = 3,8$ %

Östriolkonzentration (pmol/ml) in Männerpoolserum nach Zusatz bekannter Mengen von Östriol in Albuminphosphatpuffer	gemessene Östriolkonzentration im Festphasensystem	
	(pMol/ml)	in Prozent relativ zum eingesetzten Wert
3,4	3,6	105,8
6,9	7,2	104,3
17,3	16,9	97,7
24,2	25,1	103,7
34,6	36,2	104,6
44,9	45,0	100,2
51,9	52,6	101,3
58,8	62,1	105,6
69,2	73,2	105,8
86,5	94,8	109,6
		$\bar{x} = 103,9 \quad (\%)$ $s = 3,13 \quad (\%)$ $V_k = 3,01 \quad (\%)$

Tab. 6: Durchschnittliche Wiederfindung von Östriol bei Zusatz
bekannter Mengen Östriol zu gepooltem Männerserum
(Festphasensystem)

Zur Bestimmung der Interassayvarianz wurden 2 andere Seren an 10 aufeinanderfolgenden Arbeitstagen jeweils mit Doppelwerten bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Mittelwerte $\bar{x}$, folgende Standardabweichung s und folgender relativer Variationskoeffizient V_k :

Serum C: $\bar{x} = 17,6 \text{ pmol/ml}$, $s = 1,3 \text{ pmol/ml}$, $V_k = 7,4 \%$

Serum D: $\bar{x} = 32 \text{ pmol/ml}$, $s = 2,2 \text{ pmol/ml}$, $V_k = 6,9 \%$

c) Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit der Methode wurde aus den Ergebnissen der Untersuchungen von Männernpoolserum über die Standardabweichung von B_0 berechnet ($n = 20$):

Nachweisgrenze: = Mittelwert von B_0 minus $2 s$,
entsprechend ca. 110 pmol Östriol .

d) Zuverlässigkeit der Standardkurve

Die Zuverlässigkeit der Standardkurve wurde durch Berechnung des relativen Variationskoeffizienten des gebundenen Anteils des ^{125}J -Östriol-Derivats für jede Östriol-Konzentration aus 10 Bestimmungen pro

Kurvenpunkt geprüft. Der relative Variationskoeffizient lag dabei im Bereich zwischen 3,46 und 104 pmol/ml zwischen 2,9 und 7,8 %.

Nach folgender Transformation

$x: = \ln (\text{Östriolkonzentration des Standards in pmol/ml})$

$y: = \left[\frac{p}{100-p} \right]$, wobei p den jeweils gebundenen Anteil des ^{125}J -Östriol-Derivats in Prozent verkörpert, wurde eine lineare Regression von x auf y durchgeführt.

Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$y = - 0,85 x + 3,92$, der Korrelationsfaktor als Maß für die Linearität der Standardkurve betrug $- 0,999$.

8.) Lineare Regression und Korrelation der verschiedenen Methoden

In den Abbildungen 4 bis 6 werden die Ergebnisse der mit der Testmethode und den Referenzmethoden gewonnenen Ergebnisse der Östriol-Bestimmungen verglichen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden nach Averdunk (1) ergibt sich dabei als geometrisches Mittel der Regressionskoeffizienten der beiden jeweiligen

Regressionsgeraden, der Schnittpunkt mit der Ordinatenachse durch Einsetzen der Schnittpunktkoordinaten der beiden Regressionsgeraden (entsprechend den jeweiligen Mittelwerten der mit beiden Methoden gemessenen Östriol-Konzentrationen) in eine allgemeine Geradengleichung mit der Steigung der Ausgleichsgeraden.

Dabei seien benannt:

Methode A: Referenzmethode A (^3H -Östriol, wässriges System)

Methode T: Testmethode (^{125}J -Östriol-Derivat, Festphasensystem)

Methode B: Referenzmethode B (Reagenziensatz zur Östriolbestimmung von Amersham-Buch)

G_{AT} : Regressionsgerade der Messwerte von Methode A auf die der Methode T

G_{TA} , G_{AB} , G_{BA} , G_{TB} , G_{BT} , analog.

$\overline{G_{ATA}}$: Gleichung der Ausgleichsgeraden zwischen den Regressionsgeraden G_{AT} und G_{TA}

$\overline{G_{ABA}}$, $\overline{G_{TBT}}$ analog

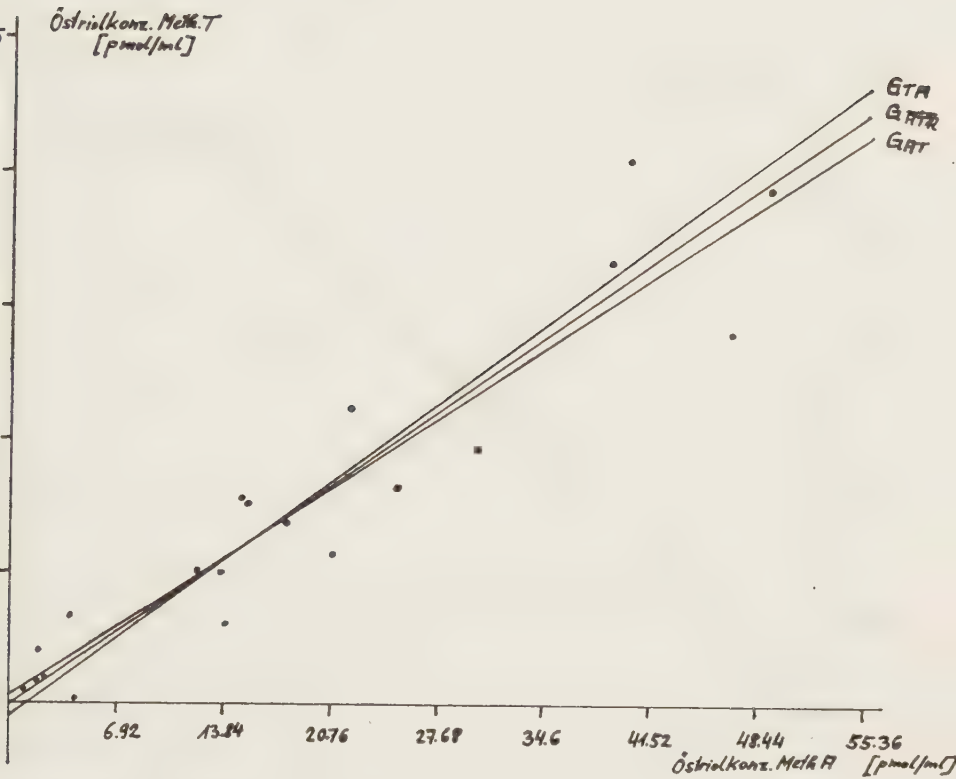


Abb. 4: Methodenvergleich:

Streudiagramm und Regressionsgeraden G_{AT} und G_{TA} ,
sowie Ausgleichsgerade $G_{\overline{ATA}}$ von Methode A und T

Methode A: Referenzmethode A (wässriges System mit
 ^3H -Östriol

Methode T: Testmethode (Festphasensystem)

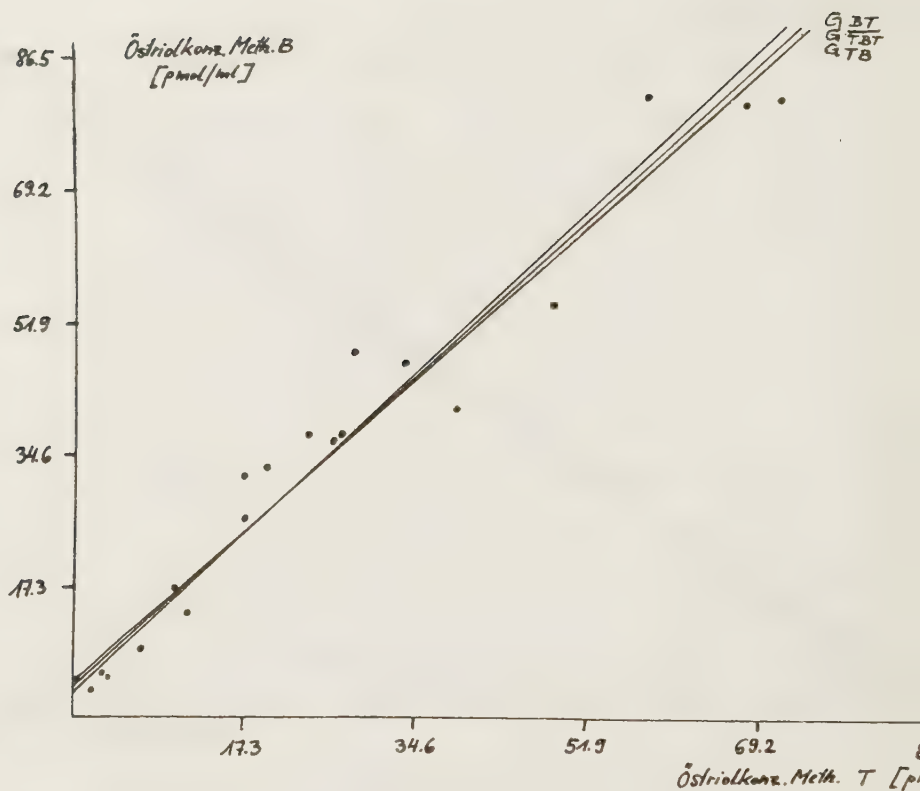


Abb. 5: Methodenvergleich:

Streuungsdiagramm und Regressionsgeraden G_{TB} , G_{BT} ,
sowie Ausgleichsgerade G_{TBT} von Methode T und B

Methode T: Testmethode (Festphasensystem)

Methode B: Referenzmethode B (Reagentiensatz von
Amersham-Buchler)

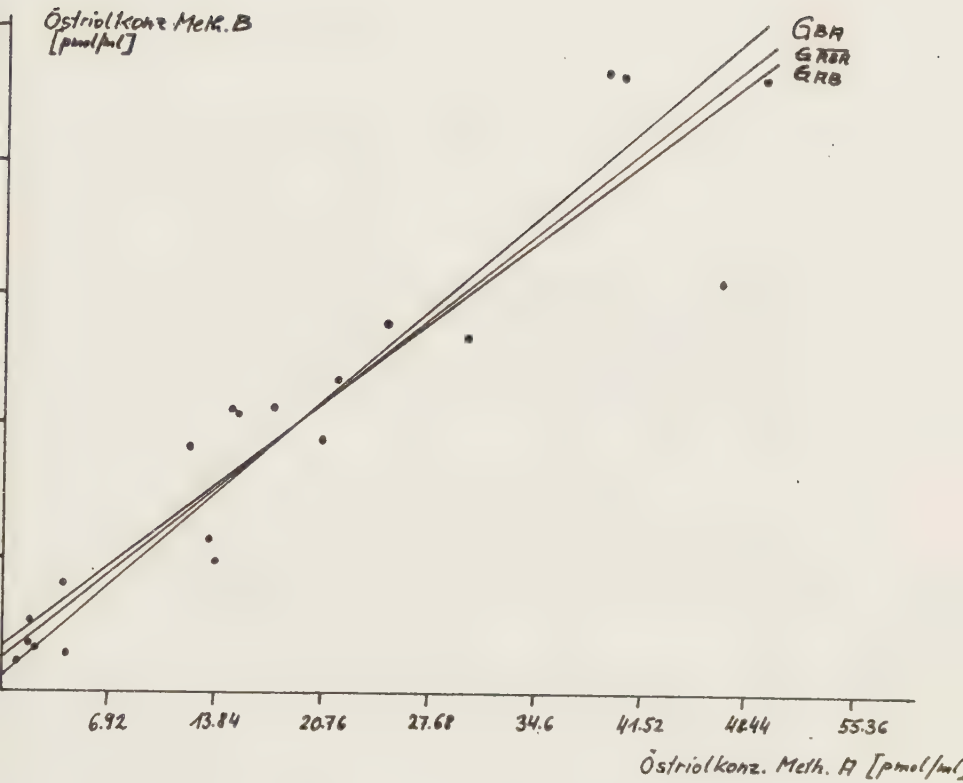


Abb. 6: Methodenvergleich

Streuungsdiagramm und Regressionsgeraden G_{AB} , G_{BA} ,

sowie Ausgleichsgerade G_{ABA} von Methode A und B

Methode A: Referenzmethode A (wässriges System

mit ^3H -Östriol

Methode B: Referenzmethode B (Reagentiensatz von

Amersham-Buchler)

Mittelwert aller Östriolkonzentrationen gemessen mit

$$\text{Methode A} \longrightarrow \bar{x}_A = 18,63 \text{ (pmol/ml)}$$

$$T \longrightarrow \bar{x}_T = 24,45 \text{ (pmol/ml)}$$

$$B \longrightarrow \bar{x}_B = 34,55 \text{ (pmol/ml)}$$

Abbildung 4 zeigt das Streudiagramm und die Regressionsgeraden G_{AT} und G_{TA} , sowie die Ausgleichsgerade $G_{\overline{ATA}}$ von Methode A und T.

Die Gleichungen der Geraden errechnen sich zu

$$G_{AT}: = y = 1,319 x + 1,079$$

$$G_{TA}: = y = 1,489 x - 2,105$$

$$G_{\overline{ATA}}: = y = 1,401 x - 0,442$$

Der Korrelationskoeffizient berechnet sich zu $R_{AT} = 0,9410$, sein Vertrauensbereich mit $\alpha = 0,05$ liegt bei $0,8511 \leq R_{AT} \leq 0,9772$.

Abbildung 5 zeigt das Streudiagramm und die Regressionsgeraden G_{TB} , G_{BT} , sowie die Ausgleichsgerade $G_{\overline{BTB}}$ von Methode T und B

Die Gleichungen der Geraden errechnen sich zu

$$G_{TB} : = y = 1,148 x + 5,062$$

$$G_{BT} : = y = 1,201 x + 4,687$$

$$G_{\overline{TBT}} : = y = 1,173 x + 4,52$$

Der Korrelationskoeffizient berechnet sich zu $R_{TB} = 0,9775$, sein Vertrauensbereich mit $\alpha = 0,05$ liegt bei $0,9411 \leq R_{TB} \leq 0,9918$.

Abbildung 6 zeigt das Streudiagramm und die Regressionsgeraden G_{AB} , G_{BA} , sowie die Ausgleichsgerade $G_{\overline{ABA}}$ von Methode A und B

Die Gleichungen der Geraden errechnen sich zu

$$G_{AB} : = y = 1,551 x + 5,279$$

$$G_{BA} : = y = 1,753 x + 1,824$$

$$G_{\overline{ABA}} : = y = 1,649 x + 3,801$$

Der Korrelationsfaktor berechnet sich zu $R_{AB} = 0,9385$,
 sein Vertrauensbereich mit $\alpha = 0,05$ liegt bei $0,8431$ -
 $R_{AB} \hat{=} 0,9761$.

Die mittleren quadratischen Abstände der jeweiligen
 Punktwolken $(X_i; Y_i)$ von der Ausgleichsgeraden
 senkrecht zu dieser (α) in Richtung Ordinate (β)
 und Abszisse (γ) sind nach Averdunk (1) gegeben durch

$$\alpha) S_{\perp} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - f(X_i))^2}{n - 2} \right)^{1/2} \cdot \cos \alpha$$

wobei n : = Anzahl der Messwerte pro Methode

$f(X_i)$: = Funktionswerte der Ausgleichsgeraden
 an der Stelle X_i

$\cos \alpha$: = Cosinus des von Abszisse und Ausgleichs-
 geraden eingeschlossenen Winkels ($< 90^\circ$)

$$\beta) \text{ s ordinate} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2}{n-2} \right)^{1/2}$$

$$\beta) \text{ s abszisse} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - f^*(y_i))^2}{n-2} \right)^{1/2}$$

wobei $f^*(y_i) :=$ Funktionswerte der von y nach x
transformierten Ausgleichsgeraden an
der Stelle y_i

Die sich für die jeweilige Ausgleichsgerade ergebenden
Werte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

	G_{ATA}	G_{ABA}	G_{TBT}
$S_{\perp}$	3,94	4,39	3,70
$S_{ordinate}$	7,68	9,21	6,16
$S_{Abszisse}$	5,49	8,13	5,23

Tab. 7: Mittlere quadratische Abstände der jeweiligen Punktwolken (X_i, Y_i) von der Ausgleichsgeraden senkrecht zu dieser ($S_{\perp}$), in Richtung Ordinate ($S_{ordinate}$) und Abszisse ($S_{Abszisse}$) in pmol/ml

IV. Diskussion

=====

Für die Zuverlässigkeit von "Sättigungsanalysen" ist die gleichmässige Zugabe des "Binders", im allgemeinen Antiserum, von ähnlicher Bedeutung wie die gleichmässige Zugabe des Indikatorliganden. Im hier beschriebenen Festphasen-System war der Antikörper in Polyacrylamid-Gel eingeschlossen, zu dessen Dosierung ein Scheide-trichter umgebaut wurde. Diese handgefertigte Einrichtung erwies sich als praktisches und zuverlässiges Werkzeug, das eine einfache Zugabe des Gels mit einer Präzision von 1,7 % ermöglicht. (Tabelle 1). Die Zusammensetzung des Gels aus Antikörper, Polyacrylamid und Methacrylsäure und die Bedingungen zur Polymerisation wurden unverändert übernommen, da sie nach den Ergebnissen früherer Untersuchungen als optimal anzusehen waren.

Zur B/F-Trennung, zur Trennung des antikörpergebundenen Indikator-Liganden vom nicht gebundenen, erwies sich das neuentwickelte Zentrifugationsverfahren als praktikabel und effizient. Die Notwendigkeit zweier Zentrifugationsschritte war durch die

Tatsache bestimmt, daß nach der Inkubation von Probe und Indikator-Ligand mit dem trägerfixierten Antikörper erst 77 % der Flüssigkeit durch die unmittelbare Zentrifugation, weitere 16 % durch die anschließende Zentrifugation mit der zusätzlichen Waschflüssigkeit abgetrennt wurden (Tabelle 2).

Das Ausmaß der Trennung der flüssigen von der festen Phase wurde durch die Radioaktivität des Zentrifugates angezeigt:

Nach Inkubation mit antikörperfreiem Gel wird die Differenz zwischen eingesetzter und im Filtrat wiedergefundener Radioaktivität (7 %) durch die Effizienz der Trennung und durch die "unspezifische" Bindung des Indikator-Liganden an die Polyacrylamid-Matrix des Antikörpers, des spezifischen Binders, und an die Wandung des Reaktionsgefäßes bestimmt (Tabelle 3).

Das Zentrifugationsverfahren zur B/F-Trennung erwies sich als wesentlich einfacher zu handhaben als das früher entwickelte Verfahren mit der Inkubation auf temperierten Säulchen, deren Elution durch parallel geschaltete Pumpen schwierig zu regulieren war.

Als Indikator-Ligand wurde an Stelle des früher verwendeten ^3H -Östriol das Östriol - 6 - carboxymethoxim - ^{125}J -Histamin (Östriol - 6 cmo - ^{125}J -His) neu in das Festphasen-Verfahren eingesetzt. In homogenen wässrigen "Sättigungsanalysen" haben ^{125}J -markierte Indikator-Liganden wegen der hohen spezifischen Aktivität, der billigeren Meßtechnik und der unproblematischen Entsorgung die ^3H -markierten Indikator-Liganden bereits vielfach verdrängt (11).

Die Kreuzreaktivitäten von Östriol - 3 - Glucuronosid und Östriol - 3 - Sulfat relativ zum Östriol unter Verwendung von Ölstriol - 6 cmo - ^{125}J -His als Indikatorhaptens im wässrigen und Festphasensystem sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. Die Meßgrößen entsprechen den Gleichgewichtskonzentrationen, da durch Verlängerung der Inkubationszeit keine Veränderungen eintraten. Als Maß der kompetitiven Potenz eines Haptens, also seiner Kreuzreaktivität, gilt seine Inhibitionsdosis, die normalerweise auf 50 % bezogen wird (ID_{50}). Da die Gerade $Y = 50$ (%) lediglich von einem Kurvenzug erreicht wird, die Gerade $Y = 87,5$ (%) jedoch von allen Kompetitionskurven geschnitten wird, soll letztere als Bezugspunkt zur Festlegung der Kreuzreaktivität gewählt werden. Dabei ist die $\text{ID}_{87,5}$

definiert als die molare Menge Hapten, die die Menge des gebundenen Indikatorhaptens auf 87,5 % vermindert. Die Kreuzreaktivität der Östriol-konjugate wird auf die $ID_{87,5}$ des korrespondierenden Haptens, des Östriols, bezogen ($ID_{87,5} \text{ Östriol} \hat{=} 100 \%$) und errechnet sich nach (5) und (6) zu

$$K = 100 \frac{\text{benötigte molare Menge des korrespondierenden Haptens für } y}{\text{benötigte molare Menge des kreuzreagierenden Haptens für } y}$$

Die Kreuzreaktivität des Östriols, gemessen als $ID_{87,5}$, liegt im Festphasen-System mit 1,6 pmol niedriger als im wässrigen System mit 0,3 pmol (siehe jeweils Kurven 1 in Abbildung 1 und 2) und findet ihren Ausdruck in einer relativ flach verlaufenden Kompetitionskurve im Festphasensystem (Kurve 1, Abbildung 2) im Vergleich zur Kompetitionskurve im wässrigen System (Kurve 1, Abbildung 1). Selbst mit Östriolkonzentrationen von 6900 pmol/ml war keine weitere nennenswerte Verdrängung des ^{125}J -Östriol-Derivats vom immobilisierten Antikörper zu erreichen. Dieser Effekt kann nicht mit der Elektronegativität der Matrix erklärt werden, da über 93 % des ^{125}J -Östriol-Derivats von der antikörperfreien Matrix eluiert werden konnte (Tabelle 2). Die Kreuzreaktivität der Konjugate verringert sich von 40 % für das Glucuronosid und von 50 % für das

Sulfat im wässrigen System auf 8,5 bzw. 9,6 % im Festphasen-system (Kurven 2 und 3 in Abbildung 1 und 2).

Diese drastische Verringerung der Kreuzreaktivitäten für die Konjugate wurde mit ihrer Abstossung durch die elektronegative Matrix erklärt (22). Offenbar wird auch bei Verwendung von Östriol - 6 cmo-¹²⁵J-His als markiertem Hapten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die Spezifität des Antiserums durch Kopplung mit einer geeigneten Matrix erhöht.

Die Ergebnisse von Wiederfindungsversuchen bei Zusatz steigender Mengen der jeweiligen Konjugate des Östriols sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Wiederfindungsrate beim Vorliegen von jeweils 4-facher molarer Konzentrationen Östriol - 3 - Sulfat und Glucuronosid im Vergleich zur Konzentration des eingesetzten Östriols ergab im Falle des wässrigen Ansatzes 450 %, im Festphasen-System 220 %, was als experimentelle Untermauerung der Hypothese gelten mag, daß die Acrylamid-Methacryl-Säure-Matrix zu einer Erhöhung der Spezifität des Anti-Östriols-Antikörpers führt.

Die Wiederfindungsrate von Östriol beim Vorliegen äquimolarer Konzentrationen von 17 - β - Östradiol und Östron wurde nur im Festphasen-System gemessen

(Tabelle 4) und betrug 104 %, was mit der statistischen Streuung von Wiederfindungsexperimenten mit Östriol im gepoolten Männerserum gut vereinbar ist ($\bar{x} = 103,9 \%$, $s = 3,1 \%$, siehe Tabelle 6) und damit nicht als Ausdruck einer relevanten Kreuzreaktivität von $17 - \beta -$ Östradiol und Östron gewertet werden kann.

Zum Vergleich der drei beschriebenen Methoden wurden die Östriol-Konzentrationen von 20 Seren schwangerer Frauen zwischen der 4. und 40. Schwangerschaftswoche gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst, die den Messungen zugrundeliegenden Standardkurven zeigt Abbildung 3.

Der Bereich der gemessenen Östriol-Konzentrationen der 20 Seren, die lediglich nach ihrer Verteilung über einen bestimmten Schwangerschaftswochenbereich (4. bis 40. Woche) gezielt, ansonsten zufällig ausgewählt wurden, ist als repräsentativ für die im Verlauf einer Schwangerschaft auftretenden Östriolkonzentrationen anzusehen (7).

Beim Vergleich der mit den 3 Methoden gemessenen Östriolkonzentrationen gewinnt man den Eindruck, daß die Methode A die niedrigsten, die Methode B die höchsten Werte liefert. Zur statistischen Charakterisierung wurden die Mittelwerte der Serumkonzentrationen für die 3 Methoden berechnet, und die Unterschiede mit dem t-Test auf Signifikanz geprüft. Auf die Verwendung des parameterfreien Wilcoxon-Tests wurde verzichtet, da viele Autoren den t-Test für ausreichend "robust" auch dann ansehen, wenn die Normalverteilung der Werte nicht gesichert ist (10). Es ergaben sich für alle drei Vergleiche signifikante Mittelwertsdifferenzen (Methode A und T, A und B für $\alpha = 0,002$, Methode T und B für $\alpha = 0,05$). Unter der Annahme einer linearen Korrelation (siehe spätere Ausführungen) zwischen den jeweiligen Wertepaaren je zweier Methoden müsste dieser signifikante Mittelwertunterschied seinen Ausdruck auch in einer signifikant von 1 verschiedenen Steigung der Ausgleichsgeraden der beiden Regressionsgeraden finden und damit das Vorliegen eines proportionalen Fehlers anzeigen. Die Prüfung erfolgte mit dem Likelihood Quotiententest nach Haeckel (10). Die Prüfgrösse

$$LR = n \times \ln \frac{(s^2_1 - s^2_2)^2 + d^2}{d^2}, \quad \text{wobei } d^2 = 4 s^2_1 \times s^2_2 (1-r^2)$$

s_1 und s_2 die Varianzen der Messwerte beider Methoden und r die Steigung der Ausgleichsgeraden darstellt, ist χ^2 - verteilt mit einem Freiheitsgrad.

Es ergaben sich signifikant von 1 unterschiedliche Steigungen der Ausgleichsgeraden für $G_{\overline{ATA}}$ und $G_{\overline{ABA}}$ für $\alpha = 0,01$ und für $G_{\overline{TBT}}$ für $\alpha = 0,05$.

Damit kann als gesichert angesehen werden, dass Methode T und B durchschnittlich höhere Werte als die Referenzmethode A, die Festphasenmethode T im Schnitt niedrigere Werte als die Methode B liefern. Der Grund dürfte bei Methode T in der zwar stark reduzierten, aber vorhandenen Kreuzreaktivität der Östriolkonjugate Östriol - 3 - Glucuronosid und Östriol - 3 - Sulfat liegend, während bei Methode A durch die Extraktionsschritte einerseits keine kreuzreagierenden Konjugate im Testansatz vorliegen und somit nicht mitgemessen werden können, andererseits Extraktionsverluste des Östriols auftreten, bei Methode B möglicherweise der Einfluß der Konjugate am stärksten zum Tragen kommt, da die Kreuzreaktivität der Östriolkonjugate lediglich von der Spezifität des verwendeten Antikörpers bestimmt wird.

Bei den nachfolgenden Überlegungen wird unterstellt, dass zwischen den zu vergleichenden Messwerten der verschiedenen Methoden ein lineares Verhältnis vorliegt. Die klassische Regressionsanalyse geht beim Vergleich zweier Messreihen von der Annahme aus, dass der zufallsbedingte Fehler der einen wesentlich grösser als der anderen ist und kommt damit zu relativ einfachen Formeln. Im vorliegenden Problem muss jedoch angenommen werden, dass alle zu vergleichenden Variablen mit einem annähernd gleich grossen und deutlich in Erscheinung tretenden zufallsbedingten Fehler behaftet sind. Wendet man die klassische Regressionsanalyse an, so erhält man je 2 voneinander abweichende Geraden, je nachdem, welcher Variablen man die grössere statistische Variabilität zuordnet. (Regressionsgeraden in Abbildung 4 bis 6). Je 2 Regressionsgeraden schneiden sich in einem Punkt, dessen Koordinaten den arithmetischen Mitteln der jeweils betrachteten Messwertmengen entsprechen.

Averdunk (1) ersetzt nun aus oben genannten Gründen die beiden Regressionsgeraden durch eine Ausgleichsgerade oder "mittlere Regressionsgerade", welche die

Beziehung zwischen den Messwerten zweier Methoden einfacher und exakter wiedergibt als 2 Regressionsgeraden. Die Ausgleichsgerade entspricht dem geometrischen Mittel zwischen der Regression der Messwerte und der einen auf die der anderen Methode und umgekehrt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 bis 6 dargestellt. Da für die zu vergleichenden Grundgesamtheiten metrische Daten (Östriolkonzentrationen) vorliegen, kann man den Grad ihres Zusammenhangs durch den Pearson - Bravais'schen Masskorrelationskoeffizienten R beschreiben. Vorausgesetzt wird dabei, dass der Zusammenhang zwischen den Messwerten je zweier Methoden annähernd linear und die Messwerte annähernd normal verteilt sind.

Die errechneten Korrelationsfaktoren $R_{AT} = 0,9410$, $R_{TB} = 0,9775$ und $R_{AB} = 0,9385$ wurden wegen des relativ kleinen Stichprobenumfangs von $n = 20$ mit dem t - Test nach Fisher (5) auf ihre Signifikanz geprüft. Alle drei Werte sind danach hochsignifikant ($\alpha = 0,001$) von Null verschieden und somit kann die

Nullhypothese, d.h. alle 3 Korrelationskoeffizienten sind rein zufallsbedingt und es besteht kein statistischer Zusammenhang zwischen den Messwerten je zweier Methoden, abgelehnt werden.

Die Berechnung der Vertrauensbereiche der Korrelationsfaktoren nach Verwerfen der Nullhypothese erfolgte nach der Fisher'schen z - Transformation (5) für $\alpha = 0,05$.

Es besteht somit, vorsichtig ausgedrückt, eine starke Korrelation als Maß für eine regelhafte Abhängigkeit zwischen den Messwerten der 3 Methoden, was auch im "Bestimmtheitsmass" oder "Determinationskoeffizienten" zum Ausdruck kommt, der angibt, in welchem Ausmass die Varianz der einen Variablen durch die Varianz der anderen Variablen bestimmt wird und rechnerisch gleich R^2 ist. Für Methode A und T, bzw. A und B ergibt sich, dass ca. 88 %, für Methode T und B ca. 95,5 % der Varianz beider Variablen determiniert sind.

- Als Streuungsmasse der Ausgleichsgeraden bzw. der beiden Regressionsgeraden schlägt Averdunk (1) die mittlere Abweichung der Punktwolke von der Ausgleichsgeraden senkrecht zu dieser bzw. die mittlere Abweichung von der jeweiligen Regressionsgeraden in Richtung der Ordinate bzw. Abszisse vor. Die zugrundeliegenden Formeln sind in Punkt III, 8 dargestellt, die Werte in Tabelle 7 zusammengefasst.
- Sie ergeben einen Anhalt für den mittleren quadratischen Abstand der Punkte zur jeweiligen Geraden und gelten als Mass für den korrelativen Zusammenhang der Messwerte zweier Methoden: je kleiner die Streuungsmasse, desto besser ist die Korrelation.

Betrachtet man die Werte der Tabelle 7, so muss man nach Averdunk (1) feststellen, dass der beste korrelative Zusammenhang zwischen Methode T und B, der am wenigsten ausgeprägte zwischen Methode A und B besteht, was mit den Voraussetzungen der 3 Methoden bezüglich ihrer Behandlung der Östriol-Konjugate erklärt werden könnte.

Die Zuverlässigkeitskriterien des Festphasenassays sind unter Punkt III, 7 a - d zusammengefasst. Die ermittelten Werte für die Richtigkeit (Wiederfindungsrate von Östriol zu gepoolten Männerserum), für die Präzision (Intra- und Interassayvarianzen), für die Empfindlichkeit (gemessen über die Standardabweichung s von B_0 als B_0 minus $2s$), für die Zuverlässigkeit der Standardkurve (Berechnung des relativen Variationskoeffizienten des gebundenen Anteils von Östriol - 6 cmo - ^{125}J -His für einen Östriolkonzentrationsbereich von 3,46 bis 104 pmol/ml) und für die Linearität der Standardkurve im Messbereich (Korrelationsfaktor der "Variablen" der Standardkurve nach (13)) liegen in Größenordnungen, die in der Literatur für diese Kriterien als Voraussetzung für ein funktionierendes Meßsystem gefordert und beschrieben werden (13, 17, 23). Somit stellt die beschriebene Festphasenmethode zur Bestimmung von Östriol im Serum schwangerer Frauen eine genügend zuverlässige, bezüglich ihrer Ergebnisse in hohem Masse mit bestehenden, bewährten Methoden korrelierende, trotz der improvisierten technischen Grundlagen relativ einfache Methode dar, die den Anforderungen für die Beurteilung des Verlaufs von Serumöstrogenkonzentrationen während einer Schwangerschaft in ausreichendem Masse gerecht wird.

V. Zusammenfassung

=====

Es wird eine Festphasenmethode beschrieben, mit der unkonjugiertes Östriol im Serum schwangerer Frauen direkt, d.h. ohne zusätzliche Extraktion bestimmt werden soll.

Anti-Östriol - C 6 - Antikörper wird in ein Polymerisat aus Methacrylsäure und Acrylamid eingeschlossen. Als markiertes Hapten wird Östriol - 6 - carboxymethoxim - ^{125}J -Histamin verwendet. Die Kreuzreaktivität von Östriol - 3 - Glucuronosid und Östriol - 3 - Sulfat, gemessen als $\text{ID}_{87,5}$, wird von 40 % bzw. 50 % im wässrigen System auf 8,5 % bzw. 9,6 % im Festphasensystem reduziert.

Die Brauchbarkeit des Festphasen-Systems zur Bestimmung von Östriol im Serum schwangerer Frauen wird durch Vergleich mit bewährten Methoden (siehe Referenz-Methode A und B) und durch Bestimmung der Richtigkeit, Präzision, Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der Methode charakterisiert.

VI. Literatur

=====

1. Averdunk R., Borner K., Korrelation der Thromoplastinzeiten bei Dicumarol behandelten Patienten unter Verwendung verschiedener Thrombokinasepräparate.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8, 263 - 268, (1970)

2. Berg D., Huber W., Kuss E., Synthesis of 125 -Iodine-labelled Indicator Haptens for Radioimmunological Determination of Catechol Estrogens;
Hoppe-Seyler-s Z. Physiol. Chem.,
360, 1685 - 1687, (1979)

3. Bodley F.H., Chapdelaine A., Flickinger G., Mikhail G., Yaverbaum S., and K.D. Roberts;
A highly specific Radioimmunoassay for Progesterone using Antibodies covalently linked to Acrylamine-Glass Particles;
Steroids, 21, 1 - 16, (1973)

4. Bolton A.E., and W.M. Hunter, The use of Antisera covalently coupled to Agarose, Cellulose and Sephadex in Radioimmunoassay Systems for Proteins and Haptens; *Biochimica et Biophysica Acta*, 329, 318 - 330, (1973)
5. Claus, Ebner u. Röhr, Lohse, Ludwig, Statistik für Soziologen, Pädagogen und Mediziner, Band 1 u. 2
6. Ekins R. P., Basic Principles and Theory; *Br. Med. Bull.* 30, 3 - 11, (1974)
7. Goebel R., u . Kuss E., Östrogene in der Schwangerschaft. I. Eine einfache und zuverlässige radioimmunologische Methode zur Bestimmung des Östriols im Schwangerenserum, *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 34, 329 - 338, (1974)

8. Goebelsmann U., Katagiri H., et al
Estriol Assays in obstetrics;
J. Steroid Biochemistry
6, 703 - 709, (1975)
9. Goodfriend T., Ball D., and S.Updike,
Antibody in polyacrylamide gel, a solid
phase reagent for radioimmunoassay;
Immunochemistry
6, 481 - 484, (1969)
10. Haeckel R., Statistische Probleme beim
Vergleich von klinisch-chemischen
Analyseverfahren.
J. clin. Chem. a. Clin. Biochem.
18, 433 - 437 (1980)
11. Jeffcoate S.L., Recent Developments in
steroid Radioimmunoassays.
J. Reprod. Fert.
51, 267 - 272 (1977)
12. Katagiri H., Distler W., et al.,
Estriol in Pregnancy. IV. Normal concentrations,
diurnal and / or episodic variations, and day-
to-day changes of unconjugated and total estriol
in late pregnancy plasma;
Am. J. Obstet. Gynecol., 124, 272 - 280 (1976)

13. Katagiri H., Stanczyk F.Z., and U. Goebelsmann,
Estriol in Pregnancy. III. Development,
Comparison and Use of specific Antisera for
rapid Radioimmunoassay of unconjugated
Estriol in Pregnancy Plasma;
Steroids,
24, 225 - 238, (1974)
14. Kuss E., and R. Goebel, Determination of
Estrogens by Radioimmunoassay with Antibodies
to Estrogen - C 6 - Conjugates. I. Synthesis
of Estrone -, Estradiol- 17 β - and Estriol
- 6 - Albumin Conjugates;
Steroids,
19, 509 - 517, (1972)
15. Kuss E., Goebel R., and H. Enderle,
Influence of Oxo-, and / or Hydroxy - Groups
at C - 16 / C - 17 of Estrogens on
Affinity to Anti-Estrone-, Anti-Estradiol
- 17 α - and Anti-Estradiol - 17 β - Antisera;
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.
354, 347 - 364, (1973)

16. Kuss E., Goebel R. and J. Zander, in:
Hormonal Investigations in Human Pregnancy,
Hormone Determination in the Management of
Pregnancies at Risk;
Ed., R. Scholler, Editions Sepe- Paris 1974
17. Liedtke R. J., Graves J.P. jr., et al.,
 ^{125}J -Radioimmunoassay for unconjugated
estriol in serum of pregnant women;
Clin. Chem.
24, 1100 - 1104 (1978)
18. Livitz M., Jirku H., Kadner S. and Young B.K.,
Estriol Conjugates in Body Fluids in late
Human Pregnancy;
J. Ster. Biochemistry,
6, 663 - 667, (1975)
19. Lorraine J.A., "Östrogen in Hormon Assays
and their Application;
The Williams and Willians Company, page
288 (1971)

20. Moore P.H., Jr. and L.R. Axelrod, A
solid-phase Radioimmunoassay for Estrogen
by Estradiol - 17 - β Antibody covalently
bound to a water insoluble Synthetic Polymer
(Enzacryl AA);
Steroids,
20, 199 - 212 (1972)
21. Schäfer A., and H. Faulstich, Vecsei P.,
and H. Hobler, A solid-phase Radioimmunoassay
for Urine Aldosterone using Antibodies
linked to Nylon Nets;
FEBS - Letters,
48, 230 - 234, (1974)
22. Sperl M., Dissertation, München (1977)
23. Standefer J., Direct RADIOimmunoassay for
Serum Estriol during Pregnancy;
Clin. Chem.
22, 484 - 488, (1976)

24. Updike S.J., Simmons J.D., Grant D.H.,
Magnuson J.A., and T.L. Goddfried, Gel
Entrapment of Antibody: A New Strategy
for Facilitating Both Manual and Auto-
mated Radioimmunoassay;
Clin. Chem.,
19, 1339 - 1344 (1973)

25. Young G.;., Jirku H., et al.,
Renal clearances of estriol conjugates
in normal human pregnancy at term;
Am. J. Obstet. Gynecol.
126, 38 - 42 (1976)

Dankvermerk

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Erich Kuss für die Überlassung des Themas, für die grosszügigen Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor und für die jederzeit bereitwillige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

=====

Ludwig Heider

geb. am 4.7.1949 in Göggingen
als Sohn des Ingenieurs Alois
Heider und seiner Ehefrau
Centa Heider, geb. Buck

Schulbildung

Volksschule Göggingen
von 1956 bis 1960
Gymnasium Starnberg
von 1960 bis 1969
Abitur 1969 im neusprachlichen Zweig

Studium

1969 bis 1972 Studium der Physik
an der Technischen Universität
München
1972 bis 1979 Studium der Human-
medizin, LMU - München
Staatsexamen Mai 1979

Berufliche Tätigkeit

April 1980 bis März 1981 als
wissenschaftlicher Assistent
an der Landesimpfanstalt München

Seit April 1981 als Assistenzarzt
an der Dermatologischen Universi-
tätsklinik München

